中国生态农业学报 2016 年 3 月 第 24 卷 第 3 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Mar. 2016, 24(3): 284−292

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.150859

三七收获后不同年限土壤微生物代谢多样性分析*

靳百慧 杨羚钰 徐玉龙 张义杰 魏正孟 康洪宽
侯永明 朱书生 朱有勇 何霞红**

(云南农业大学植物保护学院 昆明 650201)

摘 要 采用 Biolog 技术, 对云南省砚山县的盘龙、阿猛、干河 3 个乡镇进行了三七历年种植地的调查研究, 以未种植过三七的土壤为对照, 研究三七收获后 1~6 a 不同年限对土壤养分、土壤微生物对碳源利用以及土壤微生物多样性的影响。结果表明, 反映土壤微生物活性的平均颜色变化率(AWCD)并未随年限增加呈现明显变化规律; 微生物培养 96 h 活性旺盛。对 Biolog 板 31 种碳源吸光度值聚类分析表明, 3 个乡镇所取三七收获后 1 a 和 6 a 土壤微生物碳源利用均可聚为一类, 其土壤微生物碳源利用特征相似, 其余不同年限土壤微生物碳源利用聚类并未出现一定规律; 与未种植过三七的土壤相比, 三七收获后 1 a、6 a 土壤微生物均对碳水化合物类、聚合物类、羧酸类和酚类碳源的利用分别高出 25.97%~55.59%和 53.14%~65.68%; 随着三七收获后年限的增加, 土壤微生物对碳水化合物、氨基酸类、羧酸类碳源利用呈收获后 2 a 升高、4 a 和 5 a 下降趋势。收获三七后 1~6 a 土壤与未种植过三七的土壤相比, 氮、磷、钾及有机质含量差异均不显著。除干河乡外, 阿猛乡和盘龙乡收获三七后 1~6 a 土壤微生物与未种植过三七的相比, Shannon-Wiener 指数、丰富度指数、Simpson 指数均值总体差异不明显。试验说明三七轮作至少需 6 a 以上时间, 土壤微生物对不同碳源的优势利用可反映出三七连作障碍与土壤微生物群落结构差异有密切联系。

关键词 三七 连作障碍 微生物代谢 Biolog-ECO 功能多样性 多样性指数
中图分类号: S344.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2016)03-0284-09

Soil microbial diversity analysis after different years of *Panax notoginseng* harvest*

JIN Baihui, YANG Lingyu, XU Yulong, ZHANG Yijie, WEI Zhengmeng, KANG Hongkuan, HOU Yongming, ZHU Shusheng, ZHU Youyong, HE Xiahong**

(College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract Continuous cropping obstacle is a key limit factor of *Panax notoginseng* cultivation. The reason for continuous cropping obstacles, such as changes of soil microorganisms have not been clearly, especially under natural conditions. To evaluate the impact of *P. notoginseng* planting on soil microbial communities and continuous cropping obstacle mechanisms, the soil nutrients and soil microorganism community structure were investigated in different fields after different years of *P. notoginseng* harvested in three towns (Ganhe, A'meng and Panlong) in Wenshan City, Yunnan Province. In each town, 7 fields were selected as soil sampling sites. Seven fields were planted other corps rather than *P. notoginseng*, six of which were at 1 to 6 years after *P. notoginseng* harvested, the other one which never planted *P. notoginseng* was set as the control (CK). Biolog-ECO method was used to analyse the average well color development (AWCD) and diversity of microbial community to explore microbial community dynamics. The results showed that AWCD of soil microorganisms was not regularly changed with increasing years after *P. notoginseng* harvested. After cultivated for 96 hours, activity of soil microorganisms reached the highest level. Cluster analysis of utilization of 6 groups (31 kinds) of carbon resources showed that in three towns, carbon resources utilization of soils at 1 and 6 years after *P. notoginseng* harvested were classed

* 云南省发展和改革委员会重大专项项目(20112513)资助
** 通讯作者: 何霞红, 主要从事农业生物多样性与病害控制研究。E-mail: hexiahong@hotmail.com
靳百慧, 主要从事生物多样性与病害控制研究。E-mail: 18214562004@163.com
收稿日期: 2015−07−28 接受日期: 2015−12−17
* The study was supported by the Special Project of Development and Reform Commission in Yunnan Province (20112513).
** Corresponding author, E-mail: hexiahong@hotmail.com
Received Jul. 28, 2015; accepted Dec. 17, 2015

in one group, indicting the same characteristics of carbon resources utilization. No obvious regularity was observed for other years. The use of carbohydrates, polymeric substances, carboxylic acid and phenols by soil microorganisms in 1 and 6 years after *P. notoginseng* harvested were 25.97%–55.59% and 53.14%–65.68% more than those of CK. Soil nitrogen, phosphorus, potassium and organic matter contents increased at 2 years, decreased at 4 and 5 years after *P. notoginseng* harvested. Soil nitrogen, phosphorus, potassium and organic matter contents in three towns, as well as Shannon-Wiener index, evenness index and Simposon's index of soil microorganisms in A'meng and Panlong Towns at 1 to 6 years after *P. notoginseng* harvested were not significantly different compared with that of CK. The results suggested that rotation with other crops at least for 6 years was indispensable to avoid continuous cropping obstacles of *P. notoginseng*.
Keywords *Panax notoginseng*; Continuous cropping obstacle; Microbial metabolism; Biolog ECO; Functional diversity; Diversity index

土壤微生物是构成土壤生态系统的重要部分，也是土壤有机质分解、养分转化过程的参与者[1]。土壤微生物多样性反映土壤生态系统的结构与功能，特别是表现在微生物利用土壤碳源的模式上[2]。研究表明土壤微生物对耕作、施肥等变化反应敏感，其特征可作为生物指标指示土壤质量、评价土壤肥力[3]。1991 年 Garland 和 Mill[4]首次应用 Biolog 方法对土壤微生物群落进行研究。该方法通过对单一碳源利用的测定可定量描述微生物群落功能多样性，用于评价不同作物栽培措施对土壤质量的影响[5–6]，目前已普遍应用在土壤微生态领域。连作障碍是指同一作物或近缘作物连作以后，即使在正常管理的情况下，也会产生产量降低、病虫害加重、品质变劣、生育状况变差的现象[7]。三七[*Panax notoginseng* (Bruk) F. H. Chen]，一种云南省文山市种植的道地名贵中药材，为多年生宿根性草本植物[8–9]，从播种到收获，要经过 3 a 甚至更长的时间[10]。由于其生长和栽培的特性，造成三七对土壤的要求尤为苛刻，在生产上连作障碍问题非常突出，生产上主要通过 8 a 以上作物轮作或休整来解决[11]。黄天卫等[12]发现随着轮作年限的增加，三七总皂苷含量呈上升趋势，三七生长地在 5 a 以内不宜连作。本文利用 Biolog 技术，对三七道地产区云南省砚山县三七历年种植地的土壤微生物群落进行分析，研究三七收获后不同年限土壤微生物的变化，阐明随时间变化土壤微生物群落变化的规律，从而解释可能导致三七连作障碍发生的原因。

1　材料与方法

1.1　采样地点

为反映砚山县三七种植地整体土壤随三七收获后年限的变化情况，2012 年 7 月 20—22 日于三七道地产区云南省文山市砚山县干河乡(104°22′50.4″E, 23°41′48.9″N)、阿猛乡(104°35′32.6″E, 23°45′23.6″N)和盘龙乡(104°22′48.9″E, 23°31′13.7″N)3 个不同乡镇进行土样采集。每个样品均为在同一田块的 5 点取样混合而成，每块取样田面积为 666.67 m^2，采样点具体情况见表 1。

1.2　样品采集

每个采样点分别设置 4 个 20 m×20 m 的样方作为重复。去除表层覆盖物，在每个样方内以 S 型方法分别采集 5 份土壤(0~20 cm)进行混合，装入自封袋后放入盛有冰块的保温箱，带回实验室过 2 mm 筛后 4 ℃冰箱保存，用于土壤微生物 Biolog 试验和土壤理化性质的测定。

1.3　土壤理化特性测定

采集的土壤 pH 采用电位法测定，土壤有机质采用重铬酸钾容量法测定，土壤速效磷采用钼锑抗比色法测定，土壤碱解氮采用碱解扩散法测定，土壤有效钾采用 NH_4OAc 浸提–火焰光度法测定[13–15]。

1.4　土壤微生物功能多样性分析

土壤微生物代谢功能多样性采用 Biolog 方法进行分析。采样后 3 d 内用 Biolog ™ ECO Plate(以下简称 Biolog 生态板, Biolog Inc., Hayward, CA, USA)测定土壤微生物群落代谢功能。称取相当于 10 g 干重土壤样品的待测土壤，加入到装有 100 mL 无菌水的三角瓶中，摇床 260 $r \cdot min^{-1}$振荡 30 min，用 0.85% NaCl 溶液梯度稀释至 1 000 倍。用移液器将上述稀释液加入 Biolog ECO 微平板中，每孔加 150 μL, 25 ℃恒温培养，每隔 24 h 使用 Biolog 仪器读取数据，共记录 6 d[16]。

1.5　数据处理与分析

1)微平板孔中溶液吸光值平均颜色变化率(average well color development, AWCD)用于描述土壤微生物代谢活性，微生物活性随培养时间的延长而提高[5]，计算公式如下[17–18]:

$$AWCD=\sum(Ci-Ri)/n \tag{1}$$

式中: Ci 为每个有培养基孔的吸光值; Ri 为对照孔的吸光值; n 为培养基孔数, Biolog Eco 板 n 值为 31。土壤微生物群落功能多样性指数及土壤微生物特征

表 1 云南省文山市三七种植区不同土壤采样点的基本情况

Table 1 Information of soil sampling sites of pseudo-ginseng (*Panax notoginseng*) plantations located in Wenshan, Yunnan Province

采样地点 Sampling site	三七收获后年限 Years after pseudo-ginseng harvest (a)	现茬作物 Present crop	经纬度 Longitude and latitude
干河乡 Ganhe Town	CK	玉米(未种植过三七) *Zea mays* L. (never growing *Panax notoginseng*)	104°22′50.4″E 23°41′48.9″N
	1	辣椒 *Capsicum annuum* L.	
	2	撂荒 Land abandonment	
	3	辣椒 *Capsicum annuum* L.	
	4	烟草 *Nicotiana tabacum* L.	
	5	辣椒 *Capsicum annuum* L.	
	6	玉米、辣椒 *Zea mays* L., *Capsicum annuum* L.	
阿猛乡 A'meng Town	CK	葡萄、烟草(未种植过三七) *Vitis vinifera* L., *Nicotiana tabacum* L. (never growing *Panax notoginseng*)	104°35′32.6″E 23°45′23.6″N
	1	姜、玉米 *Zingiber officinale* Rosc., *Zea mays* L.	
	2	姜 *Zingiber officinale* Rosc.	
	3	烟草 *Nicotiana tabacum* L.	
	4	玉米 *Zea mays* L.	
	5	玉米 *Zea mays* L.	
	6	辣椒 *Capsicum annuum* L.	
盘龙乡 Panlong Town	CK	撂荒(未种植过三七) Land abandonment (never growing *Panax notoginseng*)	104°22′48.9″E 23°31′13.7″N
	1	姜 *Zingiber officinale* Rosc.	
	2	姜 *Zingiber officinale* Rosc.	
	3	玉米 *Zea mays* L.	
	4	玉米、西瓜 *Zea mays* L., *Citrullus lanatus*	
	5	烟草、玉米、辣椒 *Capsicum tabacum* L., *Zea mays* L., *Capsicum annuum* L.	
	6	辣椒、玉米、甘蔗 *Capsicum annuum* L., *Zea mays* L., *Saccharum officinarum* L.	

碳源的利用分析均采用培养 4 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 的数据计算，数据分析采用 SPSS 统计软件。

2)Shannon-Wiener 多样性指数(H)表示土壤微生物群体利用碳源能力的多样性，表达式为:

$$H=-\sum Pi(\ln Pi) \tag{2}$$

式中: Pi 为为第 i 孔的相对吸光值与所有整个微平板的相对吸光值总和的比值:

$$Pi=(Ci-Ri)/\sum(Ci-Ri) \tag{3}$$

Biolog ECO 板的 31 种碳源底物可分为 6 大类[19]: 碳水化合物类、氨基酸类、聚合物类、羧酸类、胺类和酚类。多样性指数可用于评价不同土壤的微生物群落多样性，多样性指数值高则表明土壤有高的微生物群落多样性[2]。

3)均匀度指数(Evenness)的表达式为:

$$E=H/\ln S \tag{4}$$

式中: H 表示 Shannon-Wiener 指数; S 是微生物可以利用的碳源数目，即颜色有变化的孔数，它是通过 Shannon 指数计算出的均度。

4)Simpson 优势度指数用于评估某些最常见种的优势度，表达式为:

$$D=\sum Pi^2 \tag{5}$$

Simpson 指数用 $1/D$ 值表示。

2 结果与分析

2.1 土壤理化特征分析

表 2 为 3 个乡镇收获三七后不同年限土壤速效钾、有效磷、碱解氮、有机质和 pH 测定均值，结果表明：三七收获后 1~6 a 的土壤与 CK 相比，除三七收获后 3 a 和 4 a 的土壤在有效磷含量差异显著外(P<0.05)，三七收获后 1~6 a 的土壤与 CK 相比，pH 和有机质、碱解氮以及速效钾含量无显著差异(P>0.05，表 2)。

2.2 土壤微生物群落结构变化

2.2.1 土壤微生物平均吸光值(AWCD)变化特征

土壤微生物平均吸光值(AWCD)反映土壤微生物群落对碳源利用的整体水平。培养开始后，每隔 24 h 测定 AWCD 值，得到 AWCD 随时间的动态变化图(图 1)。

表 2　三七收获后不同年限土壤的养分含量和 pH 变化

Table 2　Changes of soil nutrients contents and pH at different years after pseudo-ginseng (*Panax notoginseng*) harvest

三七收获后年限 Years after pseudo-ginseng harvest (a)	pH	有机质 Organic matter ($mg\cdot kg^{-1}$)	碱解氮 Available N ($mg\cdot kg^{-1}$)	有效磷 Available P ($mg\cdot kg^{-1}$)	速效钾 Available K ($mg\cdot kg^{-1}$)
CK	7.22±0.38a	25.41±5.38a	95.67±27.71a	7.80±1.32ab	200.51±82.44a
1	7.06±0.71a	26.17±6.27a	99.17±7.07a	8.45±1.72ab	238.14±132.29a
2	6.60±0.58a	26.55±1.74a	89.83±42.01a	4.53±1.43ab	230.64±159.36a
3	7.14±0.04a	24.53±3.52a	82.60±22.74a	11.20±5.46b	305.68±130.50a
4	6.94±0.80a	27.18±11.99a	104.61±66.96a	8.11±4.08a	241.19±91.61a
5	7.04±0.53a	25.29±2.53a	80.89±18.47a	7.68±6.39ab	283.84±141.35a
6	7.06±0.52a	26.93±3.85a	84.58±28.02a	6.09±1.85ab	154.99±82.11a

表中数值为供试 3 个地点的平均值。不同小写字母表示同一地点不同年限 P<0.05 水平差异显著。Data in the table were mean values of the three sampled sites. Different letters indicate significant difference (P < 0.05).

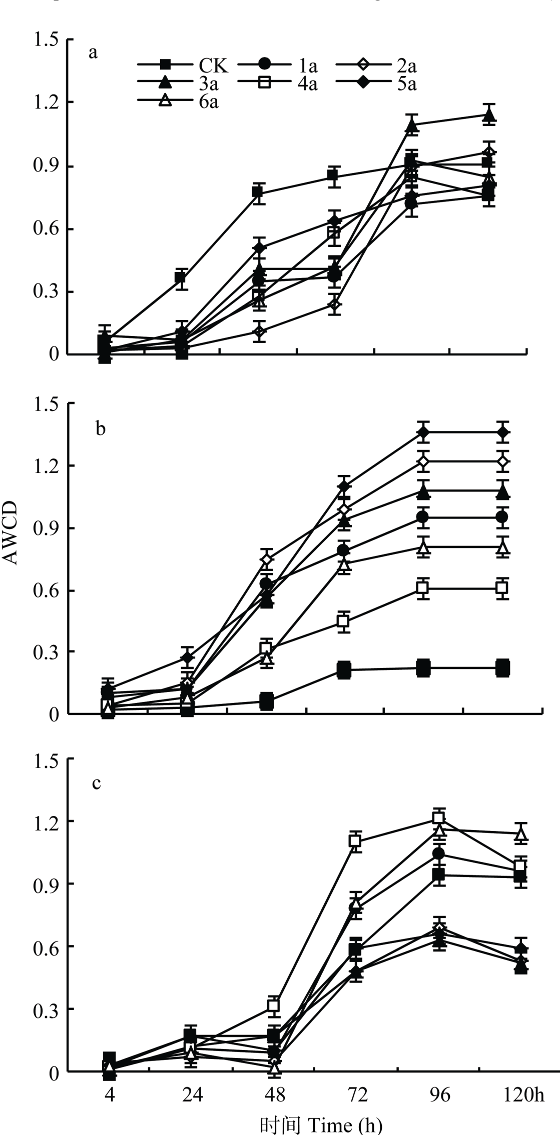


图 1　三七收获后不同年限阿猛乡(a)、干河乡(b)和盘龙乡(c)土壤微生物群落平均吸光值(AWCD)随时间的变化

Fig. 1　Changes of average well color development (AWCD) with incubation time of soil microorganism communities at different years after pseudo-ginseng (*Panax notoginseng*) harvest at A'meng Town (a), Ganhe Town (b) and Panlong Town (c) of Yunnan Province

由图 1a 得出阿猛乡土壤微生物总体变化趋势：培养起始的 24 h 内 AWCD 变化不明显，而培养 24~72 h AWCD 快速增长，此时微生物活性旺盛，直至 96 h 趋于稳定后缓慢增长。对培养 96 h 时 AWCD 均值进行分析，就年限而言，收获后 3 a 的 AWCD 均值最高，收获后 1 a 的 AWCD 均值最低，CK 的 AWCD 均值依次高于收获后 6 a、2 a、4 a 及 5 a 的 AWCD 均值。由图 1b 知，干河乡微生物总体变化趋势为：24 h 内土壤微生物活性较低，同样于 72 h 达到拐点并于 96 h 后趋于稳定，收获后 5 a 的 AWCD 均值最高，CK 的 AWCD 均值最低，收获后 2 a 的 AWCD 均值依次高于收获后 3 a、1 a、6 a 及 4 a 的 AWCD 均值。由图 1c 得出，盘龙乡土壤微生物 48 h 以内活性较低，48~72 h 是指数期，96 h 后逐渐达到平稳，收获后 4 a 的 AWCD 均值最高，收获后 3 a 的 AWCD 均值最低，收获后 6 a 的 AWCD 均值依次高于 1 a、CK、2 a、5 a 及 3 a 的 AWCD 均值。

2.2.2　土壤微生物不同碳源代谢变化特征

将 ECO 板上的 31 种碳源进行聚类分析，绘制图 2。由图 2a 可知，盘龙乡所取土样，土壤微生物不同碳源利用首先可分为三七收获后 4 a 与其余年限土样两大类，其中收获后 5 a、6 a、1 a 的土壤微生物对碳源利用划分为一类。由图 2b 可知，干河乡所取土样，土壤微生物对不同碳源利用可分为两大类：收获后 2 a、4 a 及 5 a 的土样为一类，而 CK、收获后 3 a、1 a 及 6 a 的土样聚为一类。由图 2 c 可知，阿猛乡土壤微生物对不同碳源的利用可分为 CK 与其余不同年限土样两大类，其中收获后 3 a、1 a、6 a 和 2 a 的土壤微生物碳源利用相似聚为一类。由图 2 可知，三地所取土样中，收获后 1 a 与 6 a 的土壤微生物对碳源的利用均能聚为一类，除干河乡外，收获后 1a 与 6a 均未与 CK 聚为一类；收获后 4 a 与收获后 1 a、6 a 的土壤微

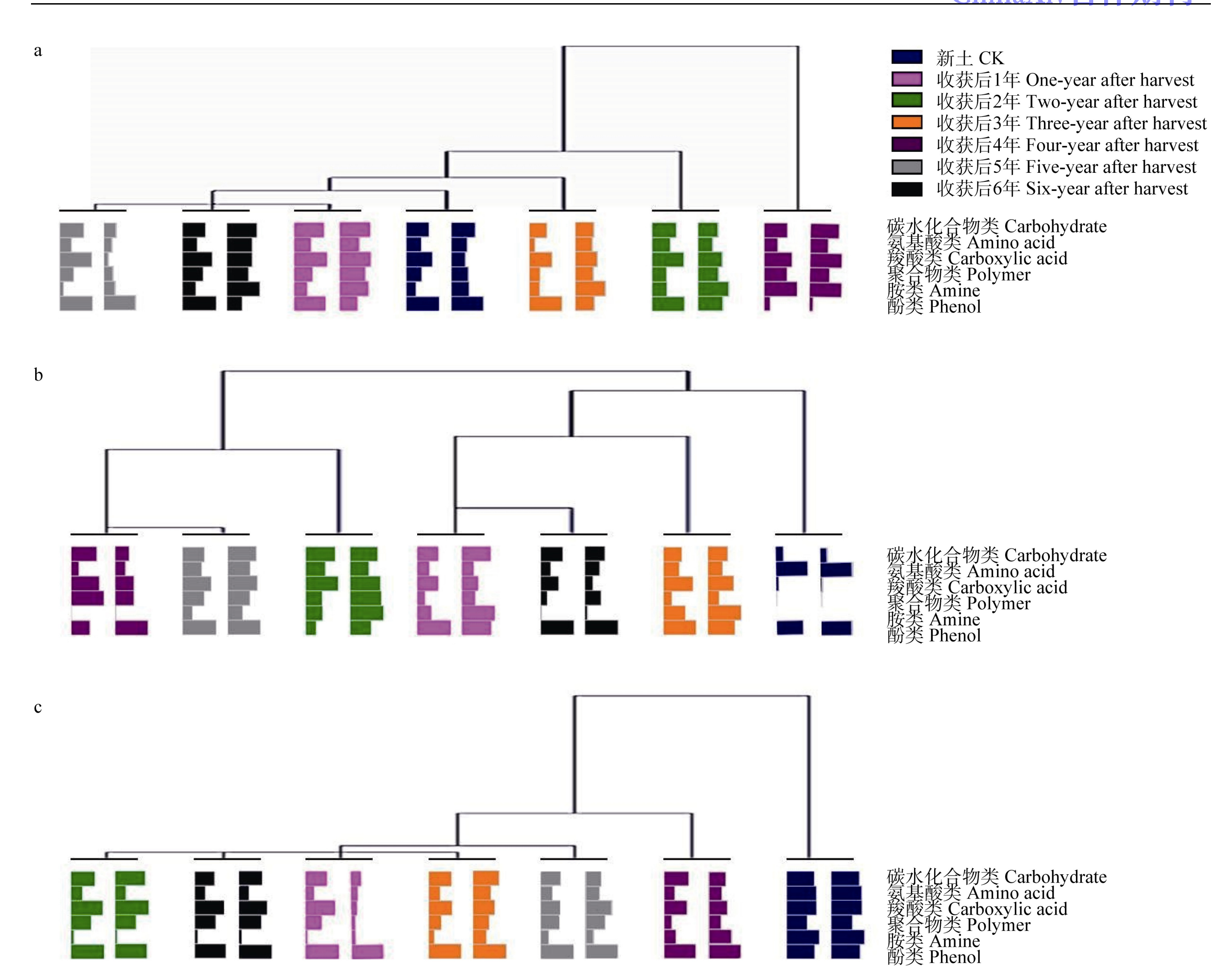


图 2 三七收获后不同年限盘龙乡(**a**)、干河乡(**b**)和阿猛乡(**c**)土壤微生物群落对六大类碳源利用的聚类分析

Fig. 2 Cluster analyses of utilization of six categories of carbon sources of soil microbial communities at different years after pseudo-ginseng (*Panax notoginseng*) harvest at Panlong Town (a), Ganhe Town (b) and A'meng Town (c) of Yunnan Province

生物碳源利用均分为不同类。

ECO板上的31种碳源按化学基团的性质，分成6类，即羧酸类、氨基酸类、碳水化合物、聚合物、胺类和酚类。将每类碳源96 h的光密度差值(C–R)平均并进行比较发现：随年限的增加，盘龙乡土壤微生物在对碳水化合物、氨基酸、羧酸类和聚合物的利用上，三七收获后2 a、3 a和5 a表现为下降，收获后1 a、4 a、6 a表现为上升；在对胺类的利用上，收获后1 a、3 a和5 a表现为下降，收获后2 a、4 a和6 a表现为增加；在对酚类的利用上，收获后1 a、2 a和4 a表现为下降，收获后3 a、5 a和6 a表现为增加。随年限的增加，干河乡土壤微生物在对碳水化合物和氨基酸的利用上，收获后3 a、4 a和6 a表现为下降，收获后1 a、2 a和5 a表现为上升；在对羧酸类的利用上，收获后4 a和6 a表现为下降，收获后1 a、2 a、3 a和5 a表现为上升；在对聚合物的利用上，收获后3 a和6 a表现为下降，收获后1 a、2 a、4 a和5 a表现为上升；在对胺类的利用上，收获后2 a、4 a和6 a表现为下降，收获后1 a、3 a和5 a表现为上升；在对酚类的利用上，收获后2 a和4 a表现为下降，收获后1 a、3 a、5 a和6 a表现为上升。随年限的增加，阿猛乡土壤微生物在对碳水化合物的利用上，收获后1 a、4 a和 5 a表现为下降，收获后2 a、3 a和6 a表现为上升；在对氨基酸的利用上，收获后1 a、4 a、5 a和6 a表现为下降，收获后2 a和3 a表现为上升；在对羧酸类的利用上，收获后4 a和5 a表现为下降，收获后1 a、2 a、3 a和6 a表现为上升；在对聚合物的利用上，收获后1 a、4 a和6 a表现为下降，收获后2 a、3 a和5 a表现为上升；在对胺类的利用上，收获后1 a、2 a、5 a和6 a表现为下降，收获后3 a和4 a表现为上升；在对酚类的利用上，收获后4 a和5 a表现为下降，收获后1 a、2 a、3 a和6 a表现为上升。

与未种植过三七的土壤相比，3 个乡镇三七收获后 1 a 和 6 a 土壤微生物对碳水化合物类、聚合物类、

羧酸类、酚类碳源的利用均值分别高出 49.61%、55.59%、44.89%、25.97%和 53.14%、65.27%、65.68%、63.70%,随着三七收获后年限的增加, 土壤微生物对碳水化合物、氨基酸类、羧酸类碳源利用呈收获后 2 a 升高, 4 a 和 5 a 下降趋势。土壤微生物群落组成结构在三七收获后 6 a 时与三七收获后 1 a 时相似且与 CK 差异明显, 这说明三七轮作需要超过一定年限(至少大于 6 a)才可进行再次种植(图 2)。

2.2.3　土壤微生物群落多样性指数变化特征

以培养 96 h 时的光密度值为依据计算三七收获后不同年限土壤微生物多样性指数(表 3)。Shannon-Wiener 指数(*H*)可以表征土壤中微生物群落的丰富度, 从表 3 可以看出, 就收获后年限而言, 干河乡收获后 5 a 的 Shannon-Wiener 指数最高, CK 的 Shannon-Wiener 指数最低, 且两者有显著差异($P<0.05$), 收获后 1 a、2 a、3 a 与 6 a 之间的 Shannon-Wiener 指数差异不显著($P>0.05$), 但与收获后 4 a 差异显著($P<0.05$); 阿猛乡 CK 的 Shannon-Wiener 指数最高, 收获后 6 a 多样性指数最低, 收获后 1~5 a 之间的多样性指数差异不显著($P>0.05$); 盘龙乡收获后 5 a 的 Shannon-Wiener 指数最高, 收获后 3 a 的 Shannon-Wiener 指数最低, 且两者间有显著差异($P<0.05$), 收获后 1 a、2 a、4 a 和 6 a 的 Shannon-Wiener 指数差异不显著($P>0.05$)。均匀度指数(*E*)可表征土壤微生物群落中各个物种个体数目分配的均匀程度, 从表 3 可以看出, 就收获后年限而言, 干河乡收获后 5 a、6 a 均匀度指数最高, CK 均匀度指数最低且与前者差异显著($P<0.05$), 收获后 2 a 和 4 a 均匀度指数低于收获后 1 a、3 a、5 a 和 6 a 且差异显著($P<0.05$); 阿猛乡和盘龙乡的 CK 与不同年限土壤间均匀度指数差异均不显著($P>0.05$), 分别高于 0.9 和 0.8。辛普森指数(*D*)可表征土壤微生物多样性, 以干河乡 CK 土壤的最低, 并且 CK 与不同年限土壤微生物多样性相比差异显著, 收获后 4 a 与不同年限土壤相比有显著差异($P<0.05$); 阿猛乡 CK 与其余不同年限土壤相比差异不显著($P>0.05$), 收获后 2 a 且与 6 a 相比差异显著($P<0.05$)。

表 3　三七收获后不同年限盘龙乡、干河乡和阿猛乡土壤微生物群落多样性指数变化

Table 3　Changes of soil microbial communities diversity indexes after different years of pseudo-ginseng (*Panax notoginseng*) harvest at Panlong Town, Ganhe Town and Ameng Town of Yunnan Province

采样地点 Sampling site	三七收获后年限 Years after pseudo-ginseng harvest (a)	香农指数 Shannon-Wiener index	均匀度指数 Evenness index	辛普森指数 Simpson index
干河乡 Ganhe Town	CK	2.25±0.22f	0.73±0.08e	0.86±0.04e
	1	2.90±0.08cd	0.92±0.03bc	0.94±0.01bc
	2	2.95±0.16bcd	0.94±0.02bcd	0.95±0.01abc
	3	2.92±0.09cd	0.93±0.01abc	0.94±0.01abc
	4	2.50±0.15ef	0.79±0.02d	0.90±0.01d
	5	3.20±0.06ab	0.95±0.01ab	0.96±0.004ab
	6	2.76±0.20d	0.95±0.02ab	0.93±0.02c
阿猛乡 A'meng Town	CK	3.39±0.02ab	0.99±0.01a	0.88±0.05ab
	1	3.11±0.04a	0.94±0.02a	0.91±0.04ab
	2	3.15±0.05a	0.94±0.02a	0.80±0.24a
	3	3.11±0.08a	0.93±0.02a	0.82±0.10ab
	4	2.96±0.12ab	0.91±0.03a	0.95±0.01ab
	5	2.99±0.19ab	0.92±0.02a	0.95±0.01ab
	6	2.85±0.29b	0.92±0.04a	0.95±0.01b
盘龙乡 Panlong Town	CK	2.78±0.27abc	0.89±0.05a	0.91±0.04ab
	1	2.86±0.14abc	0.91±0.04a	0.94±0.01ab
	2	2.52±0.94bc	0.80±0.24a	0.81±0.23b
	3	2.34±0.36c	0.82±0.10a	0.85±0.09ab
	4	3.15±0.09ab	0.95±0.01a	0.95±0.01a
	5	3.20±0.02a	0.95±0.01a	0.96±0.001a
	6	3.19±0.04a	0.95±0.01a	0.95±0.001a

表中同列不同小写字母表示同一地点同一指数在 0.05 水平上差异显著。Different small letters in the same column mean significant difference at 0.05 level for the same index at the same site.

3　讨论与结论

Biolog-Eco技术研究土壤微生物对碳源利用能力, 可以深入了解微生物群落功能的差异[20]。Biolog ECO板中的31种单一碳源一般可分为六大类, 分别是聚合物类、碳水化合物类、氨基酸类、羧酸类、胺类和酚类[20], 这几种碳源通过聚类分析和主成分分析可进一步反映环境微生物群落的代谢偏好[21]。张子龙等[22]研究发现轮作改善了三七连作土壤的微生物区系结构及理化性状, 对三七连作障碍具有很好的消减作用。本研究Biolog数据聚类分析表明, 3地所取土样中, 三七收获后1 a与6 a的土壤微生物对不同碳源的利用均能聚为一类; 除干河乡外, 收获后1 a与6 a均未与CK聚为一类; 收获后4 a与收获后1 a、6 a的土壤微生物碳源利用未聚为一类。这是由于土壤中微生物群落代谢偏好所产生的差异, 说明收获后不同年限土壤微生物群落组成不同, 三七收获后1 a及6 a与未种植过三七的土壤微生物碳源代谢不同, 三七收获后6 a仍不能种植三七。林贵兵等[23]分析研究丹参(*Salviae miltiorrhizae* Bge.)轮作栽培中微生物调节机制, 发现土壤通过各类微生物数

量和生理类群细菌群落结构的调整以建立新的土壤生态系统平衡；并发现栽培丹参后土壤微生物群落至少需要间隔2 a进行自然恢复[23]。本试验得出三七收获后1 a与6 a土壤中微生物利用聚为一类而与CK未聚为一类，这说明三七种植地所需恢复时间比前人研究的更长。

目前应用较广的丰富度、Shannon 指数和均匀度等参数，基本能代表土壤微生物群落多样性的特征[24]。陆晓菊等[25]发现，除病原菌可诱导三七连作土传病害的发生外，土壤理化性质和土壤微生物种群结构及其优势微生物的种群比例均为引起三七连作障碍的因素。干河乡、阿猛乡 2 地中收获后 6 a 的 Shannon-Wiener 指数低于其余年限，但均匀度指数均高于 0.9 且与其余不同年限土壤多样性指数差异不显著，三七收获后不同年限间土壤 Shannon-Wiener 指数差异并不显著；除阿猛乡外，CK 均匀度指数相对于三七收获后 1 a 和 6 a 土壤均较低，在未种植三七的土壤中，土壤微生物种群间比例差异大，随着三七种植后年限的增加，土壤始终保持较高的微生物功能多样性，说明土壤中微生物总量变化不明显，而土壤微生物优势种群比例降低，致使均匀度增加，这与前人的研究结论相似。

土壤微生物作为土壤有机质和养分转化与循环的动力，直接关系到土壤养分的有效性[26]。土壤微生物在作物残体降解过程中起着养分库和降解催化剂的作用，是土壤中物质分解、转化和养分循环的驱动力[27]，土壤的肥力水平与微生物活动相互影响[28]。实行轮作，有利于作物吸收养分的同时调节土壤微生物群落，改变其生活环境，使土壤养分得到充分利用[29]。连作土壤在下茬耕作时若没有及时补充养分，就有可能造成土壤养分耗绝，植株生长不良。如丹参的裂根现象被普遍认为是缺微量元素造成的[30]。郝绍卿等[31]研究发现，改善土壤的供肥条件可为人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)的优质高产提供有利条件[32]。有研究发现三七轮作间隔年限长的发病机率明显下降[33]，这可能是由三七地轮作作物对不同元素的吸收程度不同造成的，适时适量地补充肥料是减少连作损失的重要方式[34]。刘莉等[35]研究发现不同间隔年限轮作三七土壤的有效微量元素的变化不稳定，但总体而言新土(新作三七)和间隔 7 a (收获三七后 7 a 复种三七)的土样其有效微量元素含量大致相等。吴启廷等[36]研究发现种植三七后，不同轮作年限土壤中 5 种不同重金属元素并没有呈现规律性变化，张锡洲等[37]也发现轮作使土壤微生物量碳、氮和生物活性均显著升高。通过影响土壤理化性质而间接地对土壤微生物多样性及生物活性产生影响是轮作系统改良土壤的原理，轮作通过种植不同种类的作物进而改善土壤理化性质，改变土壤微生物区系，引起菌群组成结构的变化，从而增加微生物群落多样性，提高土壤酶活性，进而提高作物产量和品质。本研究发现三七收获后不同年限土壤间，大量元素(氮、磷、钾)及有机质含量差异并不显著，说明三七收获后不同年限的土壤中，大量元素含量变化不是限制三七连作的主要因素，同时也说明三七合理的轮作和间隔适当年限能减缓土壤养分比例的失调。前人对微量元素及 5 种重金属的研究也表明，三七轮作 7 a 时，与未种植三七的土壤相比仍无显著差异，这可能与其试验测定是在种植三七后而不是再次收获三七后有关。与三七收获后不同年限土壤相比，干河乡收获后 4 a 土样土壤微生物多样性显著低于其他土样；盘龙乡收获后 2 a 和 3 a 的土样中土壤微生物多样性指数相对较低，这可能与轮作作物根系分泌物影响土壤微生物的种类有关，说明轮作作物根系分泌物使微生物群落的结构、种类和数量发生了变化，这与前人的研究相吻合[38]。本研究初步表明影响土壤微生物对碳源利用的主要因子是土地利用方式、土壤类型和气候条件等。杨建忠等[39]研究证实随轮作年限的延长，三七出苗率随之上升，根腐病发生减轻，产量和质量呈上升趋势。轮作 5 a 以上的土壤三七产量和质量表现较好。本研究表明，与 CK 相比，3 个乡镇三七收获后 1 a 和 6 a 土壤微生物均对碳水化合物类、羧酸类和酚类碳源的利用较高，说明三七收获后 1 a 和 6 a 的土壤中微生物可能通过对土壤中不同碳源的利用吸收，改善土壤微生态环境。前人研究中轮作 5 a 以上三七的产量、质量较好也可能是由于土壤微生物环境的改变，为三七种植提供良好的微生态环境存在一定的联系，这还需要在以后的研究中进一步验证。与前人对三七不同年限连作土或轮作土进行的研究不同，本文通过 Biolog 技术对三七历年种植地的土壤变化进行研究，在不受三七种植的影响下，通过对比未种植过三七的土壤，发现三七收获后不同年限的土壤中，大量元素和微生物的多样性指数在各土样间并无显著差异，而土壤微生物对碳源利用差异显著；三七收获后 1 a 和 6 a 土壤微生物 Shannon-Wiener 指数低于 CK，而均匀度指数高于 CK，由此可推测三七收获后不同年限土壤变化最显著的是微生物群落结构组成的改变，收获后 6a 土壤微生物优

势种群比例仍比未种植过三七的土壤低, 这可能是导致三七收获后需要间隔至少 6 a 以上才能种植的原因之一。本研究采取的土样来自三七历年种植地, 受取样地现作作物的不同并且种植历史背景复杂的影响, 考虑到三七轮作过程中间隔年限是一个重要参考因素, 本文并未将现作作物与土壤微生物结合起来分析, 这也是本文的不足之处。对于高经济价值、高投入的中药材三七来说, 轮作年限太长会导致土地利用受限制, 这不仅限制了该产业的发展, 也难以保障优质的三七品质, 因此三七的连作障碍还需寻找现代化工程化的方式解决。

参考文献 References

[1] 王光华, 金剑, 徐美娜, 等. 植物、土壤及土壤管理对土壤微生物群落结构的影响[J]. 生态学杂志, 2006, 25(5): 550–556
Wang G H, Jin J, Xu M N, et al. Effects of plant, soil and soil management on soil microbial community diversity[J]. Chinese Journal of Ecology, 2006, 25(5): 550–556

[2] 席劲瑛, 胡洪营, 钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 138–141
Xi J Y, Hu H Y, Qian Y. Application of Biolog system in the study of microbial community[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(1): 138–141

[3] 李骁, 王迎春. 土壤微生物多样性与植物多样性[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2006, 37(6): 708–713
Li X, Wang Y C. The biodiversity of soil microbes and plant[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol, 2006, 37(6): 708–713

[4] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8): 2351–2359

[5] 孔滨, 杨秀娟. Biolog 生态板的应用原理及碳源构成[J]. 绿色科技, 2011(7): 231–234
Kong B, Yang X J. Application principle of Biolog eco board and carbon source[J]. Journal of Green Science and Technology, 2011(7): 231–234

[6] Haack S K, Garchow H, Klug M J, et al. Analysis of factors affecting the accuracy reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1458–1468

[7] 刘松涛, 李辉, 李茜. 设施蔬菜连作障碍的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(1/2): 56–58
Liu S T, Li H, Li Q. Research advances in effect of continuous cropping obstacles on facility vegetable[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2013, 19(1/2): 56–58

[8] 王淑琴, 于洪军, 官延荆. 中国三七[M]. 昆明: 云南民族出版社, 1993: 1–8
Wang S Q, Yu H J, Guan Y J. *Panax Notoginseng* in China[M]. Kunming: Yunnan Nationalities Press, 1993: 1–8

[9] 董弗兆, 刘祖武, 乐丽涛. 云南三七[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1988: 103–114
Dong F Z, Liu Z W, Le L T. *Panax Notoginseng* in Yunnan[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1998: 103–114

[10] 官会林, 陈昱君, 刘士清, 等. 三七种植土壤微生物类群动态与根腐病的关系[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(5): 706–709
Guan H L, Chen Y J, Liu S Q, et al. On the relationship between root rot in *Panax notoginseng* and soil microbes[J]. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science, 2006, 28(5): 706–709

[11] 王朝梁, 崔秀明, 李忠义, 等. 三七根腐病发生与环境条件关系的研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(12): 714–716
Wang C L, Cui X M, Li Z Y, et al. Studies on relationship between root rot on *Panax notoginseng* Burk. F. H. Chen and its environmental conditions[J]. China Journal of Chinese Meteria Medica, 1998, 23(12): 714–716

[12] 黄天卫, 张文斌, 孙玉琴, 等. 不同轮作年限三七总皂苷含量分析[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 3–4
Huang T W, Zhang W B, Sun Y Q, et al. Content determination of Sanqi (*Panax notoginseng*) total saponins planted with different rotation years[J]. Chinese Medical Journal Research and Practice, 2011, 25(3): 3–4

[13] Nelson D W, Sommers L E. Total carbon, organic carbon and organic matter[M]//Pager A L, Miller R H, Keeney D R. Methods of Soil Analysis. Madison: Soil Society of America, 1982: 595

[14] Bossio D A, Scow K M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(11): 4043–4050

[15] Thomas R L, Sheard R W, Moyer J R. Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digestion[J]. Agronomy Journal, 1967, 59(3): 240–243

[16] Classen A T, Boyle S I, Heskins K E, et al. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(3): 319–328

[17] Rogers B F, Tate III R L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(10): 1389–1401

[18] Dobranic J K, Zak J C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity[J]. Mycologia, 1999, 91(5): 756–765

[19] 周桔, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望[J]. 生物多样性, 2007, 15(3): 306–311
Zhou J, Lei T. Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity[J]. Biodiversity Science, 2007, 15(3): 306–311

[20] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(3): 203–213

[21] Swain T, Harborne J B, van Sumere C F. Biochemistry of Plant Phenolics[M]. New York: Plenum Press, 1979: 651

[22] 张子龙, 李凯明, 杨建忠, 等. 轮作对三七连作障碍的消减效应研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2015, 37(8): 39–46
Zhang Z L, Li K M, Yang J Z, et al. Effects of crop rotation for reducing continuous cropping obstacles in *Panax notoginseng* cultivation[J]. Journal of Southwest University: Natural Science, 2015, 37(8): 39–46
[23] 林贵兵, 万德光, 王瑞婷, 等. 丹参栽培对土壤微生物区系组成特征的影响[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(4): 438–443
Lin G B, Wan D G, Wang R T, et al. Research on the effects of planting *Salviae miltiorrhizae* Bge. on soil microorganism flora characteristics[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 25(4): 438–443
[24] 秦燕燕, 李金花, 王刚, 等. 添加豆科植物对弃耕地土壤微生物多样性的影响[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2009, 45(3): 55–60
Qin Y Y, Li J H, Wang G, et al. Effects of sowing legume species on functional diversity of soil microbial communities in abandoned fields[J]. Journal of Lanzhou University: Natural Sciences, 2009, 45(3): 55–60
[25] 陆晓菊, 官会林, 张正芸, 等. 三七连作根际土壤微生物区系的 16S rRNA 系统遗传多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(2): 205–213
Lu X J, Guan H L, Zhang Z Y, et al. Microbial distribution and 16S rRNA diversity in the rhizosphere soil of *Panax notoginseng*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(2): 205–213
[26] 焦永吉, 程功, 马永健, 等. 烟草连作对土壤微生物多样性及酶活性的影响[J]. 土壤与作物, 2014, 3(2): 56–62
Jiao Y J, Cheng G, Ma Y J, et al. Effects of continuous tobacco on soil microbial diversity and enzyme activities[J]. Soil and Crop, 2014, 3(2): 56–62
[27] 张彬, 白震, 解宏图, 等. 保护性耕作对黑土微生物群落的影响[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(1): 83–88
Zhang B, Bai Z, Xie H T, et al. Effect of conservation tillage on microbial community in Chinese Mollisol[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010, 18(1): 83–88
[28] 张信娣, 曹慧, 徐冬青, 等. 光合细菌和有机肥对土壤主要微生物类群和土壤酶活性的影响[J]. 土壤, 2008, 40(3): 443–447
Zhang X D, Cao H, Xu D Q, et al. Effects of photosynthetic bacteria and organic fertilizer on soil microorganisms and soil enzyme activities[J]. Soils, 2008, 40(3): 443–447
[29] 张晓玲, 潘振刚, 周晓锋, 等. 自毒作用与连作障碍[J]. 土壤通报, 2007, 38(4): 781–784
Zhang X L, Pan Z G, Zhou X F, et al. Autotoxicity and continuous cropping obstacles: A review[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2007, 38(4): 781–784
[30] 张辰露, 孙群, 叶青. 连作对丹参生长的障碍效应[J]. 西北植物学报, 2005, 25(5): 1029–1034
Zhang C L, Sun Q, Ye Q. Obstacle effect of continuous cropping on *Salvia miltiorrhiza* growth[J]. Acta BotanicaBoreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(5): 1029–1034
[31] 郝绍卿, 武侠. 老参地实行绿肥轮作后栽参的研究[J]. 特产研究, 1992(4): 21–23
Hao S Q, Wu X. Research of soil planted ginseng after implement green manure crop rotation[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 1992(4): 21–23
[32] 杨利民, 陈长宝, 王秀全, 等. 长白山区参后地生态恢复与再利用模式及其存在的问题[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(5): 546–549
Yang L M, Chen C B, Wang X Q, et al. Ecological restoration and reused modes of old ginseng land in the Changbai Mountainous area and its existing problems[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2004, 26(5): 546–549
[33] 魏巍, 许艳丽, 朱琳, 等. 长期施肥对黑土农田土壤微生物群落的影响[J]. 土壤学报, 2013, 50(2): 372–379
Wei W, Xu Y L, Zhu L, et al. Effect of long-term fertilization on soil microbial communities in farmland of black soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(2): 372–379
[34] 肖相政, 廖宗文, 杜建军. 生物有机肥对青枯病防效及土壤微生物多样性的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9): 119–122
Xiao X Z, Liao Z W, Du J J. The control effect of biological organic fertilizer on bacterial wilt and influence on soil microbial diversity[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(9): 119–122
[35] 刘莉, 赵安洁, 杨雁, 等. 三七不同间隔年限种植土壤的理化性状比较分析[J]. 西南农业学报, 2013, 26(5): 1946–1952
Liu L, Zhao A J, Yang Y, et al. Comparative analysis of physical and chemical properties of *Panax notoginseng* replant soils in different intervals[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(5): 1946–1952
[36] 吴启廷, 胡明友, 张华敬等. 三七不同轮作年限土壤中几种重金属元素含量的探究[J]. 畜牧与饲料科, 2014, 35(1): 3–4
Wu Q Y, Hu M Y, Zhang H J, et al. Study on the Content of Several Kinds of Heavy Metals in the Soil with Different Crop Rotation Years of *Panax notoginseng*[J].Animal Husbandry and Feed Science, 2014, 35(1): 3–4
[37] 张锡洲, 李延轩, 余海英, 等. 水旱轮作条件下长期自然免耕对土壤理化性质的影响[J]. 水土保持学报, 2006, 20(6): 145–147
Zhang X Z, Li Y X, Yu H Y, et al. Effects of long-term natural no-tillage on soil physiochemical properties in rice/wheat rotation systems[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2006, 20(6): 145–147
[38] 蔡立群, 齐鹏, 张仁陟, 等. 不同保护性耕作措施对麦–豆轮作土壤有机碳库的影响[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 1–6
Cai L Q, Qi P, Zhang R Z, et al. Effects of different conservation tillage measures on soil organic carbon pool in two sequence rotation systems of spring wheat and peas[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(1): 1–6
[39] 杨建忠, 孙玉琴, 韦美丽, 等. 不同轮作年限土壤对三七生长的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(2): 6–8
Yang J Z, Sun Y Q, Wei M L, et al. The effect on growth of *Panax notoginseng* in soil under rotation for the different years[J]. Chinese Medical Journal Research and Practice, 2012, 26(2): 6–8